

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

SARS-CoV-2 S gene

Handbook for the following references/
Podręcznik dotyczy urządzeń z poniższymi kodami/

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit

BD REF 444212

to be used with the BD MAX™ System
do stosowania razem z systemem BD MAX™



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in respiratory samples from patients with signs and symptoms of COVID-19 infection. This test is intended to be used as an aid in the identification in the diagnosis of COVID-19 in combination with patient's clinical signs and symptoms and epidemiological risk factors. The assay uses the BD MAX™ System for automated extraction of RNA and subsequent real-time PCR employing the reagents provided combined with universal reagents and disposables for the BD MAX™ System. RNA from respiratory specimens is detected using fluorescent reporter dye probes specific for SARS-CoV-2.

2. Summary and Explanation

Coronavirus are enveloped non-segmented positive-sense RNA viruses and belong to *Coronaviridae* family [1,2]. There are six coronavirus species known to cause human diseases [2]. Four viruses (229E, OC43, NL63 and HKU1) cause common cold symptoms and the other two (severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)) are zoonotic and producing more severe complications [2]. SARS-CoV and MERS-CoV have caused more than 10,000 cumulative cases in the past two decades, with mortality rates of 34% MERS-CoV and 10% SARS-CoV [1,3].

In December 2019, some people that worked at or lived around the Huanan seafood market in Wuhan, Hubei Province, China, have presented pneumonia of unknown cause [2,4]. Deep sequencing analysis of the respiratory samples indicated a novel coronavirus, which was named firstly 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and lately SARS-CoV-2 [5].

Human-to-human transmission of the SARS-CoV-2 has been confirmed, even in the incubation period without symptoms, and the virus causes severe respiratory illness like those SARS-CoV produced [1,6,7]. Although the pneumonia is the principal illness associated, a few patients have developed severe pneumonia, pulmonary edema, acute respiratory distress syndrome, or multiple organ failure and death [1,4]. Centers of Disease Control and Prevention (CDC) believes that symptoms of SARS-CoV-2 may appear in as few as 2 days or as long as 14 days after exposure, being the most common fever, cough, myalgia and dyspnea [1,4,8]. Less common symptoms are sore throat, headache, diarrhea and vomiting [1,4]. It seems that older males with comorbidities have been more affected [4].

Diagnosis of SARS-CoV-2 is performed detecting conventional causes of pneumonia early and detected by next-generation sequencing or real-time RT-PCR methods [1,9]. Several assays that detect the SARS-CoV-2 have been are currently available, and listed on the WHO (World Health Organization) website <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].

WHO recommends upper respiratory tract specimens (nasopharyngeal and oropharyngeal swabs) and/or lower respiratory specimens (sputum, endotracheal aspirate, or bronchoalveolar lavage) for the identification of SARS-



CoV-2 [9,11]. In addition, other clinical specimens as blood, urine and stool may be collected to monitor the presence of the virus [9,11].

3. Principle of the procedure

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit is designed for the identification of SARS-CoV-2 in respiratory samples. The detection is done in one step real time RT-PCR format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of *S* gene using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence is measured on the BD MAX™ System.

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit contains in each tube all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. SARS-CoV-2 is amplified and detected in channel 475/520 and the internal control (IC) in channel 530/565.

4. Reagents provided

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-NCO112	SARS-CoV-2 <i>S</i> gene reaction tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent Green foil	2 pouches of 12 tubes
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Solution to reconstitute the stabilized product	Transparent Orange foil	1 pouch of 24 tubes

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit with Ref. VS-NCO124 (444212).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required for use but not included in the VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit.

- Real-time PCR instrument: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 or 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519).
- Vortex.
- Micropipettes (accurate between 2 and 1000 µL).



- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- After opening the aluminum pouches which contain the reaction tubes, they can be used for up to 28 days.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use. Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and/or kits and/or lots.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Keep components away from light.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit, BD MAX™ ExK™ TNA-3 extraction kit, any additional reagents required for testing, and the BD MAX™ System are not contaminated. Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents at all times. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents and cartridges.
- To avoid contamination of the environment by amplicons, do not break apart the BD MAX™ PCR Cartridge after use. The seals of the BD MAX™ PCR Cartridge are designed to prevent contamination.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.



- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult the BD MAX™ System User's Manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. SAMPLE COLLECTION, STORAGE AND TRANSPORT

The VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit has been validated on negative nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) (Viracell S.L., Spain) and nucleic acid isolated from positive nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in VTM.

Another different types of samples from nasopharyngeal/oropharyngeal swabs in VTM must be validated by the user.

Collection, storage and transport specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, respiratory samples should be collected and labelled appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type), and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens should be transported at 2 to 8°C for up to 48 hours, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 48 hours), we recommend shipping at ≤ -20°C. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2 to 8°C for up to 48 hours or frozen at -20°C or ideally at -70°C for conservation. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

8.2. SAMPLE PREPARATION AND RNA EXTRACTION

Perform the sample preparation according to the recommendations in the instructions for use of the extraction kit used, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Note that some other samples may require pre-processing. Application-specific extraction preparation procedures should be developed and validated by the user.

1. Pipette between 200 and 750 µL of nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in viral transport media (VTM) into a BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube and close the tube with a septum cap. Ensure complete mixing by vortexing the sample at high speed for 1 minute. Proceed to BD MAX™ System Operation.

8.3. PCR PROTOCOL

Note: Please, refer to the BD MAX™ System User's Manual for detailed instructions.

8.3.1. Creating PCR test program for VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection kit

Note: If you have already created the VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection test, you can skip step 8.3.1 and go directly to 8.3.2.

- 1) On the "Run" screen of the BD MAX™ System, select the "Test Editor" tab.



- 2) Click the "Create" button.
- 3) In the "Test Name" window, name your test: i.e. VIASURE SARS-CoV-2 S gene.
- 4) In the "Extraction Type" drop down menu, select "ExK TNA-3".
- 5) In the "Master Mix Format" drop down menu, choose "Type 5".
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, then select "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)".
- 6) In the "Sample extraction parameters" select "User defined" and adjust sample volume to the volume of clinical specimen used plus 500 μL .
 - a. Example: If pipette 200 μL of respiratory clinical specimen into a BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube then set parameter to 700 μL .
 - b. Note: maximum setting is 950 μL
- 7) In the "Ct Calculation" select "Call Ct at Threshold Crossing".
- 8) In "PCR settings" tab enter the following parameters: "Channel Settings", "Gains" and "Threshold" (Table 2).
 - a. Note: Product may be used in combination with an additional VIASURE for BD MAX test, PCR Settings and Test Steps should be completed for snap 2 (green) and snap 4 (blue) positions.

Channel	Alias	Gain	Threshold	Ct Min	Ct Max
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 S gene	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	100	0	40
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Table 2. PCR settings.

Note: It is recommended to set the minimum threshold values listed above for each channel as a starting point, but the final settings must be determined by the end-user during the result interpretation in order to ensure that thresholds fall within the exponential phase of the fluorescence curves and above any background signal. The threshold value for different instruments may vary due to different signal intensities.

- 9) In "PCR settings" tab enter the following parameters "Spectral Cross Talk" (Table 3), as well

		False Receiving Channel				
	Channel	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-

Table 3. Spectral cross-talk parameters.



- 10) In "Test Steps" tab, enter the PCR protocol (Table 4).

Step Name	Profile Type	Cycles	Time (s)	Temperature	Detect
Reverse transcription	Hold	1	900	45°C	-
Initial denaturation	Hold	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection)	2-Temperature	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Table 4. PCR protocol.

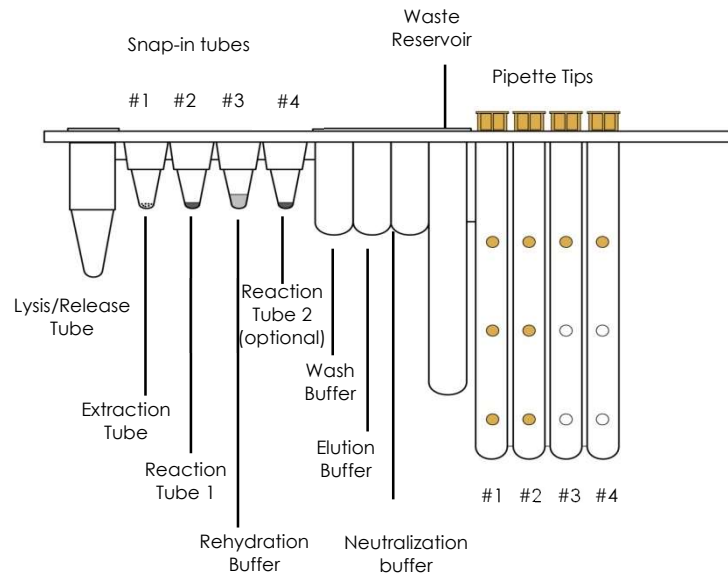
- 11) Click the "Save Test" button.

8.3.2. BD MAX™ Rack set up

- For each sample to be tested, remove one Unitized Reagent Strips from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit. Gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes and load on the BD MAX™ System sample racks.
- Remove the required number of BD MAX™ ExK TNA Extraction Tubes (B4) (white foil) from their protective pouch. Snap the Extraction Tube(s) (white foil) into its corresponding positions in the TNA strip (Snap position 1, white color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.
- Determine and separate the appropriate number of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene reaction tube (green foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 2, green color coding on the rack. See Figure 1).
 - Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
 - In order to carry out a correct rehydration, please make sure that the lyophilized product is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.
 - Note: If you choose the format "Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)" (Section 8.3.1), determine and separate the appropriate number of additional VIASURE reaction tubes (different foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 4, blue color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close aluminum pouches with the zip seal.
- Remove the required number of Rehydration Buffer tubes (orange foil) and snap into their corresponding positions in the strip (Snap position 3, non-color coding on the rack. See Figure 1). Remove excess air, and close the pouch with the zip seal.
 - In order to ensure a correct transfer, please make sure that the liquid is in the bottom of the tube and is not adhered to the top area of the tube or to the foil seal.



Figure 1. BD MAX™ TNA Reagent Strip (TNA) from the BD MAX™ ExK TNA-3 kit.



8.3.3. BD MAX™ Instrument set up

- 1) Select the "Work List" tab on the "Run" screen of the BD MAX™ System software v4.50A or higher.
- 2) In the "Test" drop down menu, select VIASURE SARS-CoV-2 S gene (if not already created see Section 8.3.1).
- 3) Select the appropriate kit lot number (found on the outer box of extraction kit used) from the pull down menu (optional).
- 4) Enter the Sample Buffer Tube identification number into the Sample tube window of the Worklist, either by scanning the barcode with the scanner or by manual entry.
- 5) Fill the Specimen/Patient ID and/or Accession window of the Worklist and click the "Save" button. Continue until all Sample Buffer Tubes are entered. Ensure that the specimen/patient ID and the Sample Buffer Tubes are accurately matched.
- 6) Place the prepared Sample Buffer Tube into the BD MAX™ Rack(s).
- 7) Load the rack(s) into the BD MAX™ System (Rack A is positioned on the left side of the BD MAX™ System and Rack B on the right side).
- 8) Place the required number of BD MAX™ PCR Cartridge(s) into the BD MAX™ System.
- 9) Close the BD MAX™ System door.
- 10) Click "Start Run" to begin the procedure.

8.3.4 BD MAX™ report

- 1) In main menu, click the "Results" button.
- 2) Either double click on your run in the list or press the "view button".
- 3) Click on "Print", select: "Run Details, Test Details and Plot..."
- 4) Click on "Print or Export button" on the "Run Reports" screen.



9. Result interpretation

For a detailed description on how to analyze data, refer to the BD MAX™ System User's manual.

The analysis of the data is done by the BD MAX™ software according to the manufacturer's instructions. The BD MAX™ software reports Ct values and amplification curves for each detector channel of each sample tested in the following way:

- Ct value of 0 indicates that there was no Ct value calculated by the software with the specified Threshold (see Table 2). Amplification curve of the sample showing a "0" Ct value must be checked manually.
- Ct value of -1 indicates that no amplification process has occurred.
- Any other Ct value should be interpreted in correlation with the amplification curve and according to the sample interpretation guidelines outlined in Table 5.

Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. In addition, check that there is no report of BD MAX™ System failure.

-Results should be read and analyzed using the following table:

SARS-CoV-2 S gene (475/520)	Internal control (530/565)	Interpretation
-	+	SARS-CoV-2 S gene RNA Not Detected
+	+/-	SARS-CoV-2 S gene RNA Detected
-	-	Unresolved (UNR) Result obtained in the presence of inhibitors in the PCR reaction or when a general problem (not reported by an error code) with the sample processing and/or amplification steps occurs.
IND	IND	Indeterminate assay result (IND). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of an instrument failure linked to an error code.
INC	INC	Incomplete assay result (INC). Due to BD MAX™ System failure. Assay result displayed in case of failure to complete run.

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification occurred

-: No amplification occurred

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40. The internal control may or may not show an amplification signal because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids instead of the internal control. In these cases, the detection of the IC is not necessary.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.



In case of unresolved results (UNR), absence of internal control signal in negative sample it is recommended to repeat the assay diluting the sample 1:10 to check for possible problems of inhibition.

The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with nasopharyngeal/oropharyngeal swab collected in VTM.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from respiratory samples must be extracted.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by SARS-CoV-2 suspicious samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- The specific primer and probe combination for detection of the S gene used in VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit designed for the detection of SARS-CoV-2, do not show significant combined homologies with the human genome, human microflora, SARS-CoV or other coronaviruses, which might result in predictable false positive.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including RNA extraction).
 - Degradation of the viral RNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown SARS-CoV-2 variants.
 - A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of RT-qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent COVID-19 or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Negative results do not preclude SARS-CoV-2 infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak viral levels during infections caused by SARS-CoV-2 have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the virus.
- If diagnostic tests for other respiratory illnesses are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that SARS-CoV-2 infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.



- A negative result does not preclude the presence of SARS-CoV-2 virus RNA in a clinical specimen. If clinical observations, patient history and epidemiological information suggest COVID-19 infection, re-testing increasing sample volume should be considered.
- In the case of obtaining Unresolved, Indeterminate or Incomplete results using VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit retesting will be required. Unresolved results may be due to the presence of inhibitors in the sample or an incorrect rehydration of lyophilized reaction mix tube. If there is an instrument failure, Indeterminate or Incomplete results will be obtained.

11. Quality control

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit contains an internal control (IC) in each reaction tube which confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

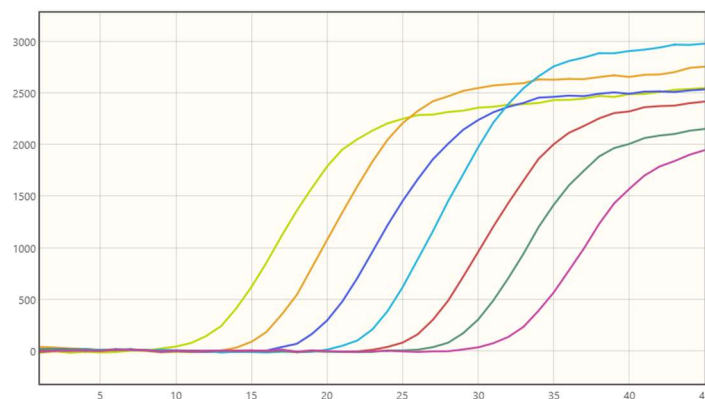
The clinical performance of VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit was tested using 4 nucleic acids isolated from positive nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs collected in VTM and 15 respiratory samples (nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs in VTM) from patients with clinical suspicion of COVID-19 disease or other similar respiratory diseases. Four SARS-CoV-2 positive samples were found and these results were in agreement with a PCR test developed according to the China CDC Primers and probes for detection 2019-nCoV. Additionally, the 4 SARS-CoV-2 positive samples were confirmed using a molecular detection method by the Spanish National Reference Center (Institute of Health Carlos III (ISCIII)) (the protocol "2019-nCoV by real-time RT-PCR" suggested by Charité (Berlin), with modifications).

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect SARS-CoV-2 using VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 24 cDNA copies per reaction (cp/rxn) with a positive rate of $\geq 95\%$.

Figure 2. Dilution series of SARS-CoV-2 *S* gene (2.4×10^7 - 2.4×10^1 cp/rxn) template run on the BD MAX™ System (475/520 (FAM) channel).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the SARS-CoV-2 S gene assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common respiratory pathogens. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested:

Cross-reactivity testing					
Human Adenovirus types 1-5, 8, 15, 31, 40 and 41	-	Influenza A/California/7/2009(H1N1)pdm09-like virus	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Human Bocavirus	-	Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09 virus	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2) virus	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Influenza A/Thüringen/5/2017 (H3N2) virus	-	Human metapneumovirus A and B	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) virus	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2) virus	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotype A and C	-	Influenza A/ South Australia/55/2014, IVR-175 (H3N2) virus	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Influenza A/DE-SH/Reihenente/AR8444/ 2016 (H5N8) virus	-	Human parainfluenza 1, 2, 3 and 4 viruses	-
Human coronavirus 229E, OC43, NL63 and HKU1	-	Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9) virus	-	<i>Pneumocytis jirovecii</i> Type A1 and g885652	-
MERS Coronavirus	-	Influenza B/Brisbane/60/2008 virus	-	Human rhinovirus type C	-
SARS Coronavirus Strain Frankfurt 1	-	Influenza B/Florida/04/06 virus	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Influenza B/Phuket/3073/2013 virus	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Influenza A/New Caledonia/20/99(H1N1) virus	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Respiratory syncytial virus (RSV) A and B	-

Table 6. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit was evaluated against RNA from Human 2019-nCoV strain BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, Human 2019-nCoV strain 2019-nCoV/Italy-INMI1, synthetic RNA controls for two variants of the SARS-CoV-2 virus: MT007544.1 (SARS-CoV2 isolate Australia/VIC01/2020) and MN908947.3 (SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1), showing positive result.



JĘZYK POLSKI

1. Przeznaczenie

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit jest przeznaczony do specyficznej identyfikacji i różnicowania nowego koronawirusa 2019 (SARS-CoV-2) w próbkach pobranych z dróg oddechowych pacjentów z objawami przedmiotowymi i podmiotowymi choroby COVID-19. Ten test jest przeznaczony do wspomagania diagnostyki choroby COVID-19 w połączeniu z klinicznymi objawami podmiotowymi i przedmiotowymi oraz epidemiologicznymi czynnikami ryzyka. Przy oznaczeniu wykorzystywany jest system BD MAX™ do zautomatyzowanej ekstrakcji RNA, a następnie-PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem dostarczonych odczynników w połączeniu z uniwersalnymi odczynnikami i materiałami jednorazowymi przeznaczonymi do stosowania z systemem BD MAX™. RNA z próbek z dróg oddechowych jest wykrywana za pomocą sond z fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym swoistych dla SARS-CoV-2.

2. Streszczenie i objaśnienia

Koronawirusy to wirusy otoczkowe, zawierające niesegmentowaną nić RNA o dodatniej polaryzacji, należące do rodziny *Coronaviridae* [1,2]. Znanych jest sześć gatunków koronawirusów powodujących choroby ludzi [2]. Cztery wirusy (229E, OC43, NL63 and HKU1) powodują objawy przeziębienia, a pozostałe dwa (koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego, SARS-CoV) oraz koronawirus bliskowschodniego zespołu oddechowego, MERS-CoV) są wirusami zoonotycznymi i dają cięższe powikłania [2]. SARS-CoV i MERS-CoV spowodowały w sumie ponad 10 000 zgonów, przy wskaźnikach śmiertelności równych 34% dla MERS-CoV i 10% dla SARS-CoV [1,3].

W grudniu 2019 r. niektóre osoby pracujące lub mieszkające wokół targu owoców morza Huanan w mieście Wuhan, prowincji Hubei w Chinach, zgłaszały się z zapaleniem płuc o nieznanym przyczynie [2,4]. Analiza głębokiego sekwencjonowania próbek pobranych z dróg oddechowych wskazała na obecność nowego koronawirusa, który najpierw otrzymał nazwę nowy koronawirus 2019 (2019-nCoV), a ostatnio — SARS-CoV-2 [5].

Potwierdzono transmisję wirusa SARS-CoV-2 między ludźmi, nawet w okresie inkubacji bez występowania objawów przedmiotowych. Wirus ten powoduje ciężką chorobę układu oddechowego podobną do choroby wywołanej przez SARS-CoV [1,6,7]. Chociaż główną chorobą związaną z tym wirusem jest zapalenie płuc, u kilku pacjentów wystąpiło ciężkie zapalenie płuc, obrzęk płuc, zespół ostrej niewydolności oddechowej lub niewydolność wielonarządowa i zgon [1,4]. Ośrodki Zapobiegania i Zwalczania Chorób (CDC) stoją na stanowisku, że objawy SARS-CoV-2 mogą występować po 2-14 dniach po ekspozycji. Najczęstszymi objawami są gorączka, kaszel, ból mięśni i duszność [1,4,8]. Rzadszymi objawami są: ból gardła, ból głowy, biegunka i wymioty [1,4]. Wydaje się, że starsi mężczyźni z chorobami towarzyszącymi wykazują cięższy przebieg choroby [4].

Rozpoznanie SARS-CoV-2 opiera się na wczesnym wykrywaniu konwencjonalnych przyczyn zapalenia płuc oraz wykrywaniu za pomocą sekwencjonowania następnej generacji lub metod PCR w czasie rzeczywistym [1,9]. Obecnie dostępnych jest kilka testów wykrywających SARS-CoV-2. Wymieniono je na stronie internetowej WHO (Światowej Organizacji Zdrowia.) <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance> [10].



WHO zaleca pobieranie próbek z górnych dróg oddechowych (nosogardła oraz jamy ustnej i gardła) i (lub) dolnych dróg oddechowych (plwocina, aspirat z rurki dotchawiczej lub materiał w płukaniu oskrzelowo-płucnego) do identyfikacji SARS-CoV-2 [9,11]. Dodatkowo w celu monitorowania obecności wirusa, można pobierać inne próbki kliniczne, takie jak krew, moczu i stolec [9,11].

3. Zasada oznaczania

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit jest przeznaczony do identyfikacji SARS-CoV-2 w próbkach z dróg oddechowych. Wykrywanie opiera się na jednoetapowym formacie oznaczania PCR w czasie rzeczywistym, w którym odwrotna transkrypcja, następnie amplifikacja swoistych docelowych sekwencji odbywa się w tej samej studzience reakcyjnej. Docelowa sekwencja izolowanego RNA podlega transkrypcji za pomocą odwrotnej transkryptazy, generując komplementarne DNA, a następnie amplifikacji konserwatywnego regionu genu S przy użyciu swoistych starterów oraz sond oznaczonych barwnikiem fluorescencyjnych.

Zasada działania Zestawu VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit opiera się na aktywności egzonukleazy 5' polimerazy DNA. Podczas amplifikacji DNA ten enzym odrywa sondę powiązaną z komplementarną sekwencją DNA, oddzielając wygaszacz od barwnika reporterowego. Reakcja ta generuje wzrost sygnału fluorescencyjnego, który jest proporcjonalny do ilości docelowej matrycy. Ta fluorescencja jest mierzona za pomocą systemu BD MAX™.

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit zawiera w każdej probówce wszystkie elementy konieczne do oznaczenia PCR w czasie rzeczywistym (swoiste startery/sondy, dNTPS, bufor, polimeraza) w postaci stabilizowanej oraz kontrolę wewnętrzną do monitorowania hamowania PCR. Wirus SARS-CoV-2 ulega amplifikacji i wykrywaniu w kanale 475/520, a kontrola wewnętrzna (IC) w kanale 530/565.

4. Dostarczane odczynniki

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit zawiera następujące materiały i odczynniki wymienione szczegółowo w Tabeli 1:

Kod	Odczynnik/materiał	Opis	Kolor	Ilość
VS-NCO112	SARS-CoV-2 S gene reaction tube	Mieszanina enzymów, starterów, sond, buforów, dNTP, stabilizatorów oraz kontroli wewnętrznej w formacie stabilizowanym	Przezroczysta zielona folia	2 woreczki po 12 probówek
VS-RB09	Rehydration Buffer tube	Roztwór do rekonstrukcji ustabilizowanego produktu	Przezroczysta pomarańczowa folia	1 woreczek po 24 probówki

Tabela 1. Odczynniki i materiały dostarczane z zestawem VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit z kodem VS-NCO124 (444212)

5. Odczynniki i sprzęt zapewniane przez użytkownika

Poniżej wymieniono materiały i sprzęt, których użycie jest konieczne, ale które nie należą do zestawu VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit.



- Przyrząd do PCR w czasie rzeczywistym: BD MAX™ System.
- BD MAX™ ExK™ TNA-3 (Ref: 442827 lub 442828).
- BD MAX™ PCR Cartridges (Ref: 437519)
- Wirówka
- Mikropipety (dokładność w zakresie 2–1000 µl)
- Końcówki z filtrem
- Bezpudrowe rękawice jednorazowe

6. Warunki transportu i przechowywania

- Zestawy można przesyłać i przechowywać w temperaturze 2–40°C do upływu terminu ważności podanego na etykiecie.
- Po otwarciu aluminiowych woreczków zawierających próbówki reakcyjne, można je użyć w ciągu maksymalnie 28 dni.

7. Środki ostrożności dla użytkowników

- Ten produkt jest przeznaczony do stosowania wyłącznie przez profesjonalnych użytkowników, takich jak fachowi pracownicy laboratorium lub fachowy personel medyczny i technicy, przeszkoleni w zakresie technik biologii molekularnej.
- Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.
- Nie należy używać przeterminowanych odczynników i (lub) materiałów.
- Nie używać zestawu, jeżeli etykieta zamykająca pudełko zewnętrzne została zerwana.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się pudełka ochronnego w chwili dostarczenia.
- Nie używać odczynników w razie otwarcia się lub rozdarcia się woreczków ochronnych w chwili dostarczenia.
- Nie stosować odczynników, jeżeli środek osuszający nie jest obecny lub jest pęknięty wewnątrz woreczków odczynników.
- Nie należy wyjmować środka osuszającego z woreczków z odczynnikami.
- Po każdym użyciu szybko zamknąć na zamek woreczki ochronne odczynników. Przed zamknięciem woreczków należy usunąć z nich nadmiar powietrza.
- Nie wolno używać odczynników, jeżeli folia została rozerwana lub uszkodzona.
- Nie wolno mieszać odczynników z różnych woreczków i (lub) zestawów i (lub) serii.
- Chronić odczynniki przed wilgocią. Przedłużająca się ekspozycja na wilgoć może wpływać na działanie produktu.
- Chronić elementy przed światłem.
- W razie przeprowadzania innych testów PCR w tej samej części laboratorium, należy zachować ostrożność, aby uniknąć skażenia zestawu VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, zestawu do ekstrakcji BD MAX™ ExK™ TNA-3, jakichkolwiek dodatkowych odczynników potrzebnych do przeprowadzania testów oraz systemu BD MAX™. Przez cały czas należy unikać skażenia odczynników drobnoustrojami oraz rybonukleazą (RNaza) / dezoksyrybonukleazą (DNaza). Zaleca się stosowanie jałowych, wolnych od RNazy / DNazy, jednorazowych końcówek do pipet, opornych na aerozole lub końcówek do pipet wyporowych. Do



każdej próbki należy stosować nową końcówkę. Przed obchodzeniem się z odczynnikami i wkładami trzeba zmieniać rękawiczki.

- Aby uniknąć skażenia środowiska amplikonami, nie należy rozłamywać wkładu BD MAX™ PCR Cartridge po użyciu. Zamknięcia wkładu BD MAX™ PCR Cartridge mają na celu zapobieganie skażeniu.
- Należy zaplanować przebieg pracy w jednym kierunku. Przeprowadzanie testu należy zaczynać w miejscu wykonywania ekstrakcji, a następnie przechodzić do miejsca wykonywania amplifikacji i detekcji. Nie należy przenosić z powrotem próbek, sprzętu i odczynników do miejsca, w którym wykonywano wcześniejszy etap testu.
- Należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej. Należy stosować odzież ochronną, jednorazowe rękawiczki, okulary i maseczkę. W miejscu przeprowadzania testu nie należy jeść, pić ani palić tytoniu. Po zakończeniu przeprowadzania testu należy umyć ręce.
- Próbkę traktować jako potencjalnie zakaźną, podobnie jak wszelkie odczynniki i materiały, które były narażone na kontakt z próbkami. Należy obchodzić się z nimi zgodnie z krajowymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa. Podczas pobierania, przechowywania, przetwarzania i utylizacji próbek należy zachowywać konieczne środki ostrożności.
- Zaleca się regularne odkażanie często używanego sprzętu, szczególnie mikropipet i powierzchni roboczych.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności i procedury opisano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™.

8. Procedura testowa

8.1. POBIERANIE, PRZECHOWYWANIE I TRANSPORT PRÓBEK

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit został zweryfikowany w odniesieniu do ujemnego wymazu z nosogardła / jamy ustnej i gardła pobranego na wirusowym podłożu transportowym (VTM) (Vircell S.L., Spain) oraz kwasu nukleinowego izolowanego z dodatniego wymazu z nosogardła / jamy ustnej i gardła pobranego na VTM.

Inne rodzaje próbek z wymazów z nosogardła / jamy ustnej i gardła na VTM muszą zostać zweryfikowane przez użytkownika.

Pobieranie, przechowywanie i transport próbek powinien odbywać się w warunkach zweryfikowanych przez użytkownika. Ogólnie, w celu zapewnienia jakości testu, próbki z dróg oddechowych należy pobierać i oznaczać odpowiednio w czystych pojemnikach z podłożem transportowym lub bez podłoża (w zależności od rodzaju próbki) i przetwarzać niezwłocznie. Transport próbek musi powinien odbywać się w temperaturze 2–8°C zgodnie z lokalnymi i krajowymi przepisami dotyczącymi transportu materiałów patogennych. W przypadku długotrwałego transportu (ponad 48 godzin) zalecamy przesyłanie w temperaturze $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Zaleca się używanie świeżych próbek do testu. Probki można przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 48 godzin lub zamrożone w temperaturze -20°C lub idealnie -70°C w celu ich konserwacji. Należy unikać cykli zamrażania i rozmrażania, aby zapobiegać degradacji próbki i kwasów nukleinowych.



8.2. PRZYGOTOWANIE PRÓBK I EKSTRAKJA RNA

Dokonać przygotowania próbek zgodnie z zalecaniami podanymi w instrukcji użytkownika zastosowanego zestawu do ekstrakcji, BD MAX™ ExK™ TNA-3. Należy pamiętać, że niektóre inne próbki mogą wymagać przetwarzania wstępnego. Procedury przygotowania ekstrakcji właściwe dla danej aplikacji powinny zostać opracowane i zweryfikowane przez użytkownika.

1. Pobrać pipetą od 200 do 750 µl wymazu z nosogardła / jamy ustnej i gardła pobranej na wirusowym podłożu transportowym i przenieść do próbki z buforem BD MAX™ TNA-3 Sample Buffer Tube i zamknąć próbkę nasadką z podkładką. Zapewnić całkowite wymieszanie poprzez wirowanie próbki przy wysokiej szybkości przez 1 minutę. Przejsć do obsługi systemu BD MAX™.

8.3. PROTOKÓŁ PCR

Uwaga: Proszę zapoznać się ze szczegółowymi informacjami znajdującymi się w podręczniku dla użytkownika BD MAX™.

8.3.1. Tworzenie programu testu PCR dla zestawu VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit

Uwaga: Jeśli użytkownik utworzył już test VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit, można pominąć etap 8.3.1 i przejść bezpośrednio do 8.3.2.

- 1) Na ekranie „Run” (Cykl) systemu BD MAX™ wybrać zakładkę „Test Editor” (Edytor testów).
- 2) Kliknąć przycisk „Create” (Utwórz).
- 3) W oknie „Test Name” (Nazwa testu) wpisać nazwę swojego testu, np. VIASURE SARS-CoV-2 S gene.
- 4) W rozwijanym menu „Extraction Type” (Typ ekstrakcji) wybrać „ExK TNA-3”.
- 5) W rozwijanym menu „Master Mix Format” (Format mieszaniny wzorcowej) wybrać „Type 5”.
 - a. Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem VIASURE dla BD MAX. W takiej sytuacji należy wybrać „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna mieszanina wzorcowa skoncentrowana liofilizowana MM z buforem rehydratacji (typ 5)) .
- 6) W „Sample extraction parameters”(Parametry ekstrakcji próbki) wybrać „User defined” (Zdefiniowane przez użytkownika) i dopasować objętość próbki do objętości użytej próbki klinicznej, dodając 500 µl.
 - a. Przykład: W przypadku przeniesienia pipetą 200 µl próbki klinicznej z dróg oddechowych do próbki z buforem BD MAX TNA-3 Sample Buffer Tube, należy wstępnie ustawić parametr na 700 µl.
 - b. Uwaga: maksymalna wartość, jaką można ustawić, to 950 µl.
- 7) W „Ct Calculation” (Obliczenie Ct) wybrać „Call Ct at Threshold Crossing”.
- 8) W zakładce „PCR settings”(Ustawienia PCR) wpisać następujące parametry: „Channel Settings” (Ustawienia kanału), „Gains” (Naddatek) oraz „Threshold” (Wartość progowa) (Tabela 2).



- a. Uwaga: Produkt można stosować razem z dodatkowym testem VIASURE dla BD MAX. W takiej sytuacji „PCR settings” (Ustawienia PCR) i „Test Steps” (Etapy testu) należy uzupełnić dla obu pozycji 2 (zielony) oraz 4 (niebieski).

Channel (Kanał)	Alias (Alias)	Gain (Nadadek)	Threshold (Wartość progowa)	Ct Min (Ct Min)	Ct Max (Ct Max)
475/520 (FAM)	SARS-CoV-2 S gene	60	100	0	40
530/565 (HEX)	IC	80	100	0	40
585/630 (ROX)	-	0	0	0	0
630/665 (Cy5)	-	0	0	0	0
680/715 (Cy5.5)	-	0	0	0	0

Tabela 2. Ustawienia PCR

Uwaga: Zaleca się ustawianie dla każdego kanału minimalnych wartości progowych podanych powyżej jako punktu startowego, ale ostateczne ustawienia musi ustalić użytkownik końcowy w trakcie interpretacji wyników w celu upewnienia się, że wartości progowe przypadają w obrębie fazy eksponencjalnej krzywych fluorescencji i powyżej wszelkich sygnałów tła. Wartości progowe dla różnych instrumentów mogą być różne ze względu na różne intensywności sygnału.

- 9) W zakładce „PCR settings” (Ustawienia PCR) wpisać też następujące parametry „Spectral Cross Talk” (Tabela 3)

		False Receiving Channel (Fałszywy kanał odbiorczy)					
		Channel (Kanał)	475/520	530/565	585/630	630/665	680/715
Excitation Channel (Kanał pobudzenia)	475/520	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	530/565	0.0	-	0.0	0.0	0.0	0.0
	585/630	0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0
	630/665	0.0	0.0	0.0	-	0.0	0.0
	680/715	0.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0

Tabela 3. Parametry „Spectral cross-talk”

- 10) W zakładce „Test Steps” (Etapy testu) wpisać protokół PCR (Tabela 4)

Step Name (Nazwa etapu)	Profile Type (Typ profilu)	Cycles (Cykle)	Time (s) (Czas/czasy)	Temperature (Temperatura)	Detect (Wykrywanie)
Reverse transcription (Odwrotna transkrypcja)	Hold (Wstrzymanie)	1	900	45°C	-
Initial denaturation (Wstępna denaturacja)	Hold (Wstrzymanie)	1	120	98°C	-
Denaturation and Annealing/Extension (Data collection) (Denaturacja i hybrydyzacja/wydłużanie (gromadzenie danych))	2-Temperatura (2-Temperatura)	45	10	95°C	-
			58	60°C	✓

Tabela 4. Protokół PCR

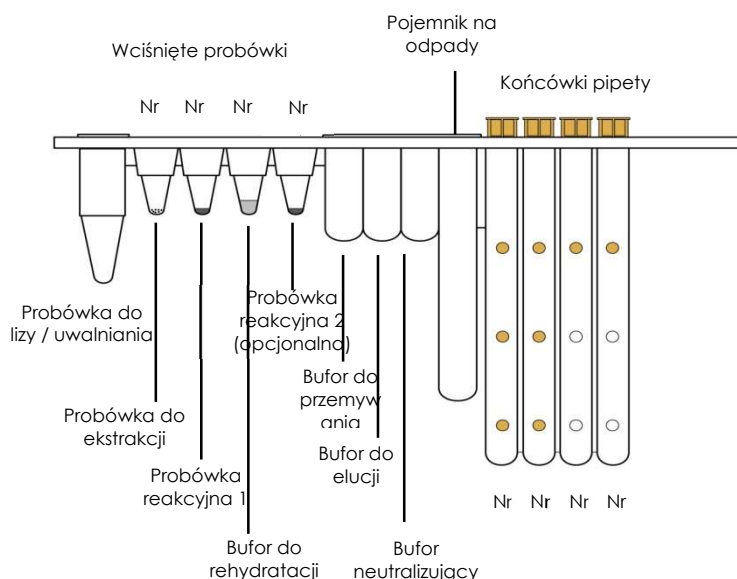
- 11) Kliknąć przycisk „Save test” (Zapisz test).



8.3.2. Ustawienie statywu BD MAX™

- 1) Dla każdej próbki, która ma być poddana testowi należy wyjąć jeden indywidualny pasek odczynnikowy z zestawu BD MAX™ ExK TNA-3. Delikatnie uderzyć każdym paskiem o twardą powierzchnię, aby upewnić się, że wszystkie płyny znajdują się na dnie próbek i załadować na statyw na próbki systemu BD MAX™.
- 2) Wyjąć potrzebną liczbę próbek do ekstrakcji BD MAX™ ExK TNA Extraction Tubes (B4) (biała folia) z saszetki ochronnej. Wcisnąć próbkę (próbki) do ekstrakcji w odpowiadające jej (im) miejsca w pasku TNA (Pozycja 1, biały kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
- 3) Określić i oddzielić odpowiednią liczbę próbek VIASURE SARS-CoV-2 S gene reaction tube (zielona folia) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (pozycja 2, zielony kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.)
 - a. Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
 - b. Aby prawidłowo przeprowadzić rehydratację, należy upewnić się, że liofilizowany produkt znajduje się na spodzie próbki i nie przylega do górnej powierzchni próbki ani do foliowego zamknięcia.
 - i. Uwaga: Jeśli użytkownik wybrał format „Dual Master Mix Concentrated Lyophilized MM with Rehydration Buffer (Type 5)” (Podwójna mieszanina wzorcowa skoncentrowana liofilizowana MM z buforem rehydratacji (typ 5)) (Punkt 8.3.1), należy określić i oddzielić odpowiednią liczbę dodatkowych próbek reakcyjnych VIASURE (inna folia) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca w pasku (pozycja 4, niebieski kolor kodu na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczki aluminiowe na zamek.
- 4) Wyjąć potrzebną liczbę próbek Rehydration Buffer tube (pomarańczowa folia) i wcisnąć je w odpowiednie miejsca na pasku (Pozycja 3, brak koloru kodowego na statywie. Patrz Rysunek 1.) Usunąć nadmiar powietrza i zamknąć woreczek na zamek.
 - a. Aby zapewnić prawidłowy transfer, należy upewnić się, że płyn znajduje się na spodzie próbki i nie przylega do górnej powierzchni próbki ani do foliowego zamknięcia.

Rysunek 1. Pasek odczynnikowy BD MAX™ TNA (TNA) z zestawu BD MAX™ ExK TNA-3.



8.3.3. Ustawienie przyrządu BD MAX™

- 1) Wybrać zakładkę „Work list” (Lista robocza) na ekranie „Run” (Cykl) oprogramowania systemu BD MAX™ w.4.50A lub wyższej.
- 2) W rozwijanym menu „Test” wybrać VIASURE SARS-CoV-2 S gene (jeśli jeszcze nie utworzono, patrz Punkt 8.3.1).
- 3) Wybrać odpowiedni numer serii zestawu (można go znaleźć na zewnętrznym pudełku używanego zestawu do ekstrakcji) z rozwijanego menu (opcjonalnie).
- 4) Wpisać numer identyfikacyjny próbówki z buforem próbki do okna „Sample tube” (Probówka z próbka) w ramach „Worklist” (Listy roboczej), skanując kod paskowy skanerem lub wpisując ręcznie.
- 5) Wpisać identyfikator próbki lub pacjenta i (lub) okno „Accession” w ramach „Worklist” (Listy roboczej) i kliknąć przycisk „Save” (Zapisz). Kontynuować aż do wpisania wszystkich próbek z buforem próbki. Upewnić się, że identyfikator próbki lub pacjenta oraz probówki z buforem próbki zostały dokładnie dopasowane.
- 6) Umieścić przygotowaną próbówkę z buforem próbki w statywie (statywach) BD MAX™.
- 7) Załadować statyw (statywy) do systemu BD MAX™ (statyw A po lewej stronie systemu BD MAX™, a statyw B – po prawej).
- 8) Włożyć potrzebną liczbę wkładów BD MAX™ PCR Cartridge do systemu BD MAX™.
- 9) Zamknąć drzwiczki systemu BD MAX™.
- 10) Kliknąć „Start Run” (Rozpocznij cykl), aby rozpocząć procedurę.

8.3.4. Raport BD MAX™

- 1) W menu głównym kliknąć przycisk „Results” (Wyniki).
- 2) Kliknąć dwukrotnie na swoim cyklu na liście lub wcisnąć przycisk „View” (Wyświetl).
- 3) Kliknąć „Print” (Drukuj), wybrać: „Run Details, Test Details and Plot...” (Szczegóły Cyklu, Szczegóły Testu i wykres...)
- 4) Kliknąć „Print or Export button” (Przycisk drukowania lub eksportu) na ekranie „Run Reports” (Raporty cyklu)

9. Interpretacja wyników

Szczegółowe informacje na temat analizowania danych podano w Podręczniku Użytkownika systemu BD MAX™.

Analiza danych jest przeprowadzana przez oprogramowanie BD MAX™ zgodnie z instrukcjami producenta. Oprogramowanie BD MAX™ zgłasza wartości Ct i krzywe amplifikacji dla każdego kanału detektora dla każdej badanej próbki w następujący sposób:

- wartość Ct wynosząca 0 wskazuje, że nie została przez oprogramowanie obliczona wartość Ct przy określonym progu (patrz Tabela 2). Krzywą amplifikacji dla próbki wykazującej wartość Ct „0” musi zostać sprawdzona ręcznie.
- Wartość Ct wynosząca -1 wskazuje, że nie nastąpił proces amplifikacji.
- Każdą inną wartość Ct należy zinterpretować w korelacji z krzywą amplifikacji i zgodnie z wytycznymi interpretacji próbki streszczonymi w Tabeli 5.



Należy sprawdzić sygnał kontroli wewnętrznej, aby sprawdzić, czy mieszanina do amplifikacji działa prawidłowo. Dodatkowo należy sprawdzić, czy nie ma raportu o awarii systemu BD MAX™.

-Wyniki należy odczytywać i analizować przy pomocy poniższej tabeli:

SARS-CoV-2 S gene (475/520)	Kontrola wewnętrzna (530/565)	Interpretacja
-	+	SARS-CoV-2 S gene RNA nie wykryto
+	+/-	SARS-CoV-2 S gene RNA wykryto
-	-	Wynik nierozstrzygający (UNR, ang. Unresolved) uzyskany w obecności inhibitorów w reakcji PCR lub w razie wystąpienia błędu ogólnego (niezgłaszanego z kodem błędu) w trakcie przetwarzania próbki i/lub amplifikacji.
IND	IND	Nieokreślony wynik oznaczenia (IND, ang. Indeterminate). Spowodowany awarią systemu BD MAX™. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku powiązanej z kodem błędu awarii urządzenia.
INC	INC	Niepełny wynik oznaczenia (INC, ang. Incomplete). Spowodowany awarią systemu BD MAX™. Wynik oznaczenia wyświetlany w przypadku nieprzeprowadzenia pełnej serii oznaczeń.

Tabela 5. Interpretacja próbki

+: Amplifikacja wystąpiła

-: Amplifikacja nie wystąpiła

Uznaje się, że próbka dała wynik dodatni, jeśli uzyskana wartość Ct jest mniejsza niż 40. Kontrola wewnętrzna może wykazywać sygnał amplifikacji lub nie ponieważ wysoka liczba kopii sekwencji docelowej może spowodować preferencyjną amplifikację kwasów nukleinowych swoistych dla sekwencji docelowej zamiast kontroli wewnętrznej. W tych wypadkach wykrywanie IC nie jest konieczne.

Uznaje się, że próbka dała wynik ujemny, jeśli próbka nie wykazuje sygnału amplifikacji w systemie detekcji, ale kontrola wewnętrzna jest dodatnia. Hamowanie reakcji PCR można wykluczyć za pomocą amplifikacji kontroli wewnętrznej.

W przypadku wyników nierozstrzygających (UNR), braku sygnału kontroli wewnętrznej w próbce, która dała wynik ujemny, zalecamy powtórzenie próby przy rozcieńczeniu próbki w stosunku 1:10 w celu sprawdzenia pod kątem ewentualnych problemów z hamowaniem.

Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych oraz innych testów diagnostycznych.

10. Ograniczenia stosowania testu

- Wyniki testu powinien oceniać członek fachowego personelu medycznego w kontekście wywiadu medycznego, klinicznych objawów przedmiotowych oraz innych testów diagnostycznych.
- Chociaż ten test można stosować przy innych rodzajach próbek, zweryfikowano go w odniesieniu do wymazów z nosogardła / jamy ustnej i gardła pobranych na VTm.



- Jakość testu zależy od jakości próbki; konieczne jest wyekstrahowanie właściwego kwasu nukleinowego z próbek z dróg oddechowych.
- Możliwe jest wykrycie niezwykle niskich poziomów sekwencji docelowych poniżej granicy wykrywania, ale wyniki mogą nie być powtarzalne.
- Istnieje możliwość uzyskania fałszywie dodatnich wyników z powodu skażenia krzyżowego przez SARS-CoV-2 którejkolwiek próbki zawierającej wysokie stężenia docelowej sekwencji RNA lub skażenia spowodowanego produktami PCR z poprzednich reakcji.
- Specyficzna kombinacja starterów i sond do wykrywania genu *S* wykorzystywana w zestawie VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit przeznaczonym do wykrywania wirusa SARS-CoV-2 nie wykazuje znaczących kombinowanych homologii z ludzkim genomem, ludzką mikroflorą, wirusem SARS-CoV lub innymi koronawirusami, co mogłoby prowadzić do przewidywalnych wyników fałszywie dodatnich.
- Wyniki fałszywie dodatnie mogą wynikać z kilku czynników i ich połączeń, w tym:
 - Niewłaściwych metod pobierania próbek, ich transportu, przechowywania i/lub obchodzenia się z nimi.
 - Niewłaściwych procedur przetwarzania (w tym ekstrakcji RNA).
 - Degradacji RNA wirusa podczas przesyłania/przechowywania i/lub przetwarzania.
 - Mutacja lub polimorfizm w rejonach wiązania starterów lub sond mogą wpływać na wykrywanie nowych lub nieznanymi wariantów wirusa SARS-CoV-2.
 - Ilość wirusa w próbce poniżej granicy wykrywania testu.
 - Obecność inhibitorów RT-qPCR lub innych typów substancji zakłócających. Nie oceniano wpływu szczepionek, leków przeciwwirusowych, antybiotyków, chemioterapeutyków lub immunosupresantów stosowanych w celu zapobiegania wystąpienia choroby COVID-19 lub stosowanych w trakcie leczenia zakażenia.
 - Nieprzestrzeganie instrukcji stosowania oraz procedury przeprowadzania testu.
- Wyniki ujemne nie wykluczają zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i nie należy ich używać jako jedynej podstawy podejmowania decyzji dotyczących leczenia lub innego postępowania z pacjentem. Nie określono optymalnych rodzajów próbek ani czasu występowania maksymalnych stężeń wirusa w trakcie zakażenia wirusem SARS-CoV-2. Do wykrycia wirusa może być konieczne pobranie wielu próbek (różne rodzaje i punkty czasowe) od tego samego pacjenta.
- Jeśli badania diagnostyczne pod kątem innych chorób układu oddechowego są ujemne, a objawy kliniczne pacjenta i informacje epidemiologiczne sugerują możliwość zakażenia wirusem SARS-CoV-2, wówczas należy wziąć pod uwagę wynik fałszywie ujemny i rozważyć ponowne wykonanie testu.
- Ujemny wynik nie wyklucza obecności RNA wirusa SARS-CoV-2 w próbce klinicznej. Jeśli obserwacje kliniczne, wywiad pacjenta i informacje epidemiologiczne sugerują zakażenie COVID-19, należy rozważyć ponowne wykonanie badania próbki o zwiększonej objętości.
- W przypadku uzyskania wyników nierozstrzygujących, nieokreślonych lub niepełnych przy użyciu zestawu VIASURE SARS-CoV-2 *S* gene Real Time PCR Detection Kit konieczne będzie powtórzenie testu. Wyniki nierozstrzygujące mogą być skutkiem obecności inhibitorów w próbce lub niewłaściwej rehydratacji w próbówce z liofilizowaną mieszaniną reakcyjną. W razie awarii urządzenia uzyskuje się wyniki nieokreślone lub niepełne.



11. Kontrola jakości

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit zawiera kontrolę wewnętrzną (IC) w każdej probówce reakcyjnej, potwierdzającą prawidłowe zastosowanie techniki.

12. Charakterystyka wydajnościowa

12.1. Czulość i swoistość kliniczna

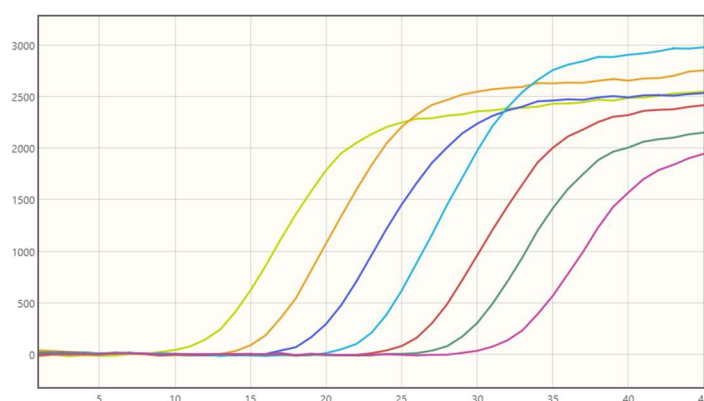
Działanie kliniczne zestawu VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit badano przy użyciu 4 kwasów nukleinowych izolowanych z dodatnich wymazów z nosogardła i (lub) jamy ustnej i gardła pobranych w VTM oraz 15 próbek z dróg oddechowych (wymazów z nosogardła i (lub) jamy ustnej i gardła na VTM) od pacjentów z podejrzeniem klinicznym choroby COVID-19 lub innych podobnych chorób układu oddechowego. Wykryto cztery próbki z dodatnim wynikiem SARS-CoV-2 i wyniki te zgadzały się z testem PCR opracowanym na podstawie starterów i sond chińskich CDC do wykrywania SARS-CoV-2. Dodatkowo 4 wyniki próbek z dodatnim wynikiem SARS-CoV potwierdzono przy użyciu metody detekcji molekularnej opracowanej przez Hiszpański Krajowy Ośrodek Referencyjny (Instytut Zdrowia Carlos III, ISCIII) (protokół "2019-nCoV by real-time RT-PCR" zasugerowany przez Charité (Berlin), z modyfikacjami).

Tak więc wyniki te wskazują na wysoką czulość i swoistość wykrywania wirusa SARS-CoV-2 przy użyciu zestawu VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Czulość analityczna

Zestaw VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit wykazuje ograniczenie wykrywania do ≥ 24 kopii cDNA na reakcję ze wskaźnikiem wyników dodatnich wynoszącym $\geq 95\%$.

Rysunek 2. Rozcieńczenia seryjne dla cyklu matrycy SARS-CoV-2 S gene ($2,4 \cdot 10^7$ - $2,4 \cdot 10^1$ kopii/reakcję) na systemie BD MAX™ (kanał 475/520 (FAM)).



12.3. Swoistość analityczna

Swoistość wykrywania SARS-CoV-2 S gene potwierdzono, badając panel składający się z różnych mikroorganizmów reprezentujących najczęściej występujące patogeny zakażeń dróg oddechowych. Nie wykryto reaktywności krzyżowej w odniesieniu do żadnego z następujących przebadanych mikroorganizmów:

Badania reaktywności krzyżowej					
Ludzki Adenovirus typy 1-5, 8, 15, 31, 40 i 41	-	Wirus Influenza A/California/7/2009 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella dumoffii</i>	-
Ludzki bokawirus	-	Wirus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella longbeachae</i>	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	-	Wirus Influenza A/Singapore/GP1908/2015, IVR-180 (H1N1)pdm09	-	<i>Legionella micdadei</i>	-
<i>Bordetella holmesii</i>	-	Wirus Influenza A/Victoria/210/2009 (H3N2)	-	<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	Wirus Influenza A/Thüringen/5/17 (H3N2)	-	Ludzki metapneumovirus A i B	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	Wirus Influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	-	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydia caviae</i>	-	Wirus Influenza A/Hong Kong/4801/2014, NYMC X-263B (H3N2)	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
<i>Chlamydia psittaci</i> genotyp A i C	-	Wirus Influenza A/South Australia/55/2014, IVR -175 (H3N2)	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	-	Wirus Influenza A/DE-SH/Reihenente/AR8444/2016 (H5N8)	-	Ludzkie wirusy parainfluenza 1, 2, 3 i 4	-
Ludzki koronawirus 229E, OC43, NL63 i HKU1	-	Wirus Influenza A/Anhui/1/2013 (H7N9)	-	<i>Pneumocystis jirovecii</i> typ A1 i g885652	-
Koronawirus MERS	-	Wirus Influenza B/Brisbane/60/2008	-	Ludzki rinowirus typ C	-
SARS Koronawirus szczep Frankfurt 1	-	Wirus Influenza B/Florida/04/06	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	-	Wirus Influenza B/Phuket/3073/2013	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Wirus Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	-	<i>Legionella bozemanii</i>	-	Ludzki wirus syncytialny dróg oddechowych (RSV) A i B	-

Tabela 6. Referencyjne patogenne mikroorganizmy używane w tym badaniu.

12.4. Reaktywność analityczna

Reaktywność zestawu VIASURE SARS-CoV-2 S gene Real Time PCR Detection Kit oceniano w odniesieniu do RNA z ludzkiego wirusa 2019-nCoV szczep BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1, ludzkiego wirusa 2019-nCoV szczep 2019-nCoV/Italy-INM11, syntetycznych kontroli RNA dla dwóch wariantów wirusa SARS-CoV-2: MT007544.1 (SARS-CoV2 izolowany w Australii/VIC01/2020) oraz MN908947.3 (SARS-CoV-2 izolowany w Wuhan-Hu-1), uzyskując wyniki dodatnie.

13. Bibliography/Bibliografia

1. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
2. Zhu N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMod2001017.



3. Światowa Organizacja Zdrowia. MERS situation update. grudzień 2019 Dostępne z <http://applications.emro.who.int/docs/EMCSR246E.pdf?ua=1&ua=1>. Dostęp marzec 2020 r.
4. Chen N. et al.. Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia in Wuhan, China. *The Lancet*, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
5. Ministerstwo Zdrowia. Rząd Hiszpanii Procedimiento de actuación frente a casos de infección por el nuevo coronavirus (SARS-CoV-2). Aktualizacja 27/02/2020. Dostępne z https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov-China/documentos/Procedimiento_COVID_19.pdf. Dostęp marzec 2020 r.
6. Lu R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 2020. DOI : 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
7. Rothe C. et al. Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 2020. DOI : 10.1056/NEJMc2001468.
8. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). 2019 Novel Coronavirus, Symptoms. Dostępne z <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>. Dostęp marzec 2020 r.
9. Światowa Organizacja Zdrowia. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 17 stycznia 2020. Dostępne z <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>. Dostęp marzec 2020 r.
10. Światowa Organizacja Zdrowia. Novel Coronavirus (2019-nCoV) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Dostępne z <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>. Dostęp marzec 2020 r.
11. Światowa Organizacja Zdrowia. Global Surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Wstępne wytyczne. 27 lutego 2020. Dostępne z [https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov)). Dostęp marzec 2020 r.

14. Symbols for IVD components and reagents/Symbole dla elementów i odczynników IVD

	In vitro diagnostic device Urządzenie do diagnostyki w warunkach in vitro		Keep dry Przechowywać w suchym miejscu		Use by Użyć przed		Manufacturer Producent		Batch code (Lot) Kod partii (seria)
	Consult Instructions for Use Sprawdzić w Instrukcji Użycia		Temperature limitation Ograniczenie temperatury		Contains sufficient for <n> test Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów		Sample diluent Rozcieńczalnik próbek		Catalog number Numer katalogowy

BD MAX™ is a registered trademark of Becton, Dickinson and Company.









CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.cerTest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC